مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/ دوره پانزدهم/ تابستان ۱۳۸۹/ ۷۸-۷۰

جداسازی لژیونلا پنوموفیلا از نمونه‌های محیطی و سیستم‌های آب لوله‌کشی و بررسی تأثیر ایمنی‌زایی سلول کامل کشته شده آن در موش

یوسف مطهری نیا[۱]، رضا شاپوری[۲]، مهدی رهنما[۳]، محمد رضا علی رمائی[۱]، محمد رضا رحمانی[۴]، محمد علی رضایی[۵]

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه و پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران

۲-استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه و پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران (مؤلف مسؤول) تلفن: ۰۲۴۱-۴۲۲۱۰۳۰

rezashapoury@yahoo.com

۳-استادیار گروه فیزیولوژی جانوری، دانشکده علوم پایه و پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران

۴-استادیار گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

۵- مربی گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

چکیده

زمینه و هدف: لژیونلا پنوموفیلا، عامل پنومونی در انسان می‌باشد. هدف از این مطالعه جداسازی لژیونلا پنوموفیلا از آبهای راکد، میادین شهری، کولرهای آبی و شیرهای آب لوله کشی و بررسی ایمنی‌زایی سلول کامل کشته شدهٔ این باکتری در موش است.

روش بررسی: نمونه‌ها ابتدا تغلیظ، سپس روی محیط کشت انتخابی (GVPC) کشت داده شدند. پس از تأیید لژیونلا پنوموفیلا، برای تهیهٔ سلول کامل کشته شده، بیوماس باکتری با استفاده از فرمالین ۰/۵٪ برای ۲٤ ساعت فیکس شد. چهار گروه موش مادهٔ نوع BALB/c (هر گروه شامل ۱۵ موش) انتخاب شد. به دوگروه از موشها سه دوز به میزان 4×10^{8} CFU از سلول کامل کشته شده به فواصل دو هفته‌ای به صورت داخل صفاقی و به دو گروه دیگر به عنوان شاهد فقط محلول سالین تزریق شد. پس از دو هفته از آخرین تزریق به یک گروه واکسینه شده و شاهد دوز کشندهٔ لژیونلا پنوموفیلا تزریق شد و٦ هفته پس از آخرین واکسیناسیون چلنج برای دو گروه دیگر نیز انجام شد.

یافته‌ها: از ۱۲۰ نمونه گرفته شده ۲۵ نمونه آلوده به لژیونلا پنوموفیلا بودند. نتایج چلنج نشان داد که تأثیر ایمنی‌زایی سلول کامل کشته شده دو هفته پس از آخرین واکسیناسیون ۹۳/۳۳٪ و بعد از شش هفته ۸٦/٦٦٪ بوده است.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که آبهای راکد دارای بیشترین آلودگی به این باکتری بودند. همچنین سلول کامل کشته شدهٔ آن یک کاندید مناسب برای مطالعات بیشتر روی واکسن لژیونلا پنوموفیلا می‌باشد.

کلید واژه‌ها: لژیونلا پنوموفیلا، آبهای راکد، سلول کشته شده، ایمنی‌زایی

وصول مقاله: ۸۹/۳/۲ اصلاحیه نهایی: ۸۹/۴/۲۸ پذیرش مقاله: ۸۹/۵/۳

مقدمه

در ماه جولای سال ۱۹۷٦ در یک اجتماع سالیانه لژیونرهای آمریکایی در هتلی در منطقهٔ فیلادلفیا یک پنومونی شدید در میان شرکت‌کنندگان رخ داد که طی آن در این اجتماع، ۲۲۱ نفر بیمار شده که ۳٤ تن از آنها جان سپردند. ٦ ماه پس از این حادثه جوزف مک دادی و چارلز شفرد عامل این همه‌گیری را یک باکتری گرم منفی دانسته که به علت وقوع آن در اجتماع لژیونرها به نام لژیونلا پنوموفیلا معروف شد. اگرچه بیشتر از ۲۰ گونهٔ لژیونلا توانایی ایجاد بیماری لژیونر را دارند اما

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-10-27]

بیشترین میزان بیماری رخ داده توسط لژیونلا پنوموفیلا سروتایپ ۱ بوده است. لژیونلا پنوموفیلا یک باکتری گرم منفی سخت رشد است که مسئول بیماری لژیونر بوده که یک فرم شدید از پنومونی است و می‌تواند کشنده باشد و همچنین عامل بیماری تب پونتیاک نیز بوده که یک بیماری خود محدود شونده است. این باکتری را می‌توان در سیستم‌های آبی ساخته شده توسط انسان همچون سیستم‌های تهویه و خنک‌کنندهٔ هوا یافت. این سیستم‌ها با تولید قطره‌های ریز آب آلوده به لژیونلا پنوموفیلا عامل عمدهٔ شیوع عفونت به این باکتری بوده‌اند (۱). با تنفس این قطره‌های آلوده، باکتری وارد ریه شده و توسط ماکروفاژها بلعیده می‌شوند. طی این عمل لژیونلا پنوموفیلا از اتصال لیزوزوم به فاگوزوم‌های آلوده جلوگیری کرده و داخل واکوئل‌ها تکثیر می‌نماید و منجر به ادم ریه و پنومونی می‌شود که می‌تواند کشنده باشد (۲). در طبیعت لژیونلا پنوموفیلا در تمامی منابع آب شیرین مشاهده شده و توانایی زیست در بیوفیلم و آمیب را دارد. مطالعات نشان داده است که حضور این باکتری در آمیب باعث تشدید قدرت بیماری‌زایی آن در سلول‌های پستانداران می‌شود. تخمین زده شده که لژیونلا پنوموفیلا سالانه مسئول ۲۵۰۰۰ مورد پنومونی در ایالات متحده می‌باشد که به علت مشکل بودن جدا سازی و تشخیص این باکتری در نمونه‌های کلینیکی احتمالاً این رقم بسیار بیشتر از این باشد (۴ و۳). لژیونلا پنوموفیلا مقاوم به مقدار کلر موجود در آب تصفیه شده می‌باشد و بنابراین به راحتی وارد سیستم‌های آب لوله‌کشی می‌شود (۵). جلوگیری از شیوع بیمارستانی لژیونلا پنوموفیلا هنوز به عنوان یک مشکل مهم و غیر قابل حل باقی مانده است، چنان که مطابق یک تحقیق انجام گرفته در فرانسه ۸۰٪ بیمارستانهای این کشور آلوده به این باکتری بوده‌اند (۶). مطالعات در طول سه دههٔ گذشته نشان داده است که آنتی‌ژنهای خام و تخلیص شدهٔ لژیونلا پنوموفیلا تحریک‌کنندهٔ سلولهای ایمنی در شرایط آزمایشگاهی بوده‌اند (۷). این باکتری همچون دیگر باکتریهای گرم منفی دیگر دارای آنتی‌ژن‌های بسیاری از جمله: لیپوپلی ساکارید، پروتئین شوک گرمایی، پروتئین‌های غشای خارجی، فلاژل و پیلی می‌باشد (۸). در بیماران لژیونر پاسخ ایمنی سلولی و هومورال به این باکتری ایجاد می‌شود. مشخص شده است که ایمنی به واسطهٔ سلول نقشی حیاتی در مقابل لژیونلا پنوموفیلا در دفاع از میزبان دارد (۱۰و۹). در راستای این مشاهدات، هدف از این مطالعه جداسازی لژیونلا پنوموفیلا از آبهای راکد، میادین شهری، کولرهای آبی و شیرهای آب لوله کشی و بررسی ایمنی‌زایی سلول کامل کشته شده این باکتری در موش است.

روش بررسی

این مطالعه از نوع تجربی و در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی زنجان انجام شده است.

جداسازی لژیونلا پنوموفیلا: در این روش از ارلن‌های ۱۲۰۰ میلی‌لیتری استریل برای نمونه‌برداری استفاده شد. حجم نمونه‌ها به میزان یک لیتر و نمونه‌ها از سطح آب و در ساعت‌های مختلف روز گرفته شده و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌ها از مخازن آبی کولرها، جریان آب شیرهای آشامیدنی، حوض‌های میادین شهری و آبهای راکد محیط جمع‌آوری شده است. در روش نمونه‌گیری از شیرهای آب، به طور معمول شیرهای مورد نظر با شعله الکلی استریل شده

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-10-27]

سپس به میزان ۲ تا ۳ دقیقه شیر آب باز مانده و پس از آن نمونه به میزان یک لیتر از آب شیر گرفته شد.

یک لیتر از نمونهٔ مورد نظر را توسط فیلترهای پلی‌کربنات ۰/۲۲ µm تغلیظ نموده و فیلترها را در ۵ ml از آب نمونه قرار داده و به مدت ۳۰ دقیقه هم زده شد. سپس ۲ ml از آن در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. ۲ ml دیگر نیز در بافر اسیدی محلول Hcl-Kcl با pH:۲ به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. سپس ۰/۱ ml از نمونه تیمار نشده و ۰/۱ml از نمونهٔ تیمار شده با حرارت و ۰/۲ml از نمونهٔ تیمار شده با اسید را هر کدام به صورت جداگانه روی محیط (GVPC) که دارای شارکول، عصارهٔ مخمر، آگار، ایسز بافر، L سیستئین، فریک پیرو فسفات، گلیسین وآنتی‌بیوتیک‌های: پلی میکسین، سیکلو هگزامايد و ونکومایسین بود کشت داده شد. پلیت‌های کشت داده شده در هوای مرطوب با CO_2 ۲/۵٪ و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ روز انکوبه شد. پلیت‌های کشت شده را در روزهای ۳، ۵ و۱۰ بررسی نموده و کلونی‌هایی که از لحاظ شکل و رنگ و همچنین تست‌های اکسیداز و کاتالاز شبیه لژیونلا پنوموفیلا بودند جدا کرده و روی محیط BCYE-α و محیط‌های BCYE-α بدون سیستئین و آگار خون دارکشت داده و به مدت ۳ روز در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. کلونی‌هایی که در این مدت روی محیط BCYE-α رشد کرده اما روی محیط‌های BCYE-α بدون سیستئین و آگار خون‌دار رشد نکرده بود به عنوان کلونی لژیونلا شناخته می‌شد (۶).

تشخیص لژیونلا پنوموفیلای سروتایپ ۱: مشخصات میکروسکوپی لژیونلا پنوموفیلا توسط رنگ‌آمیزی گرم و استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شد (۱۱). برای این باکتری تست‌های کاتالاز و اکسیداز انجام گردید (۱۲). برای روش هیدرولیز هیپورات، یک محلول غلیظ از باکتری را در ۰/٤ ml هیپورات سدیم ۱٪ حل کرده و در ۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۲ ساعت قرار داده شد، سپس ۰/۲ml نین هیدرین ۳/۵٪ در استون: بوتانول با نسبت ۱:۱ به محلول باکتری اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۵ درجه سانتیگراد انکوبه شد (۱۳). در تست هیدرولیز نشاسته باکتری مورد نظر را روی محیط کشت نشاسته آگار کشت داده و به مدت ٤۸ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نموده سپس با استفاده از محلول لوگول که حاوی ید می‌باشد کلونی‌ها از لحاظ هیدرولیز نشاسته بررسی شد (۱۴). برای تست بتا لاکتاماز، یک تودهٔ سنگین از کشت تازه باکتری را برداشته و در یک محلول حاوی ۰/۱ میلی‌لیتر از بنزیل پنی‌سیلین با رقت ٦ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۰/۱ مول بر لیتر بافر فسفات با pH:۷/۳ حل شده سپس این محلول را به میزان یک ساعت در دمای اتاق انکوبه نموده سپس به آن دو قطره از یک محلول تازهٔ نشاسته حل شده در آب بوسیلهٔ حرارت ۱۰۰ سانتیگراد با رقت ۰/۱ درصد اضافه شد. در نهایت به محلول تولید شدهٔ مورد نظر یک قطره از معرف ید که حاوی ۲/۰۳ گرم ید و ۵/۳۲ گرم یدید پتاسیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب است اضافه شد (۱۶ و ۱۵). در تست آگلوتیناسیون از کیت تجاری آگلوتیناسیون لاتکس (Oxoid ,UK) برای تأیید نهایی لژیونلا پنوموفیلا استفاده شد (۱۷).

کشت انبوه لژیونلا پنوموفیلا سروتایپ ۱ و تهیه سلول کامل کشته شده: در این روش محیط کشت مایع (YEB) برای کشت انبوه استفاده شد که یک لیتر آن شامل: ۱۰ گرم ایسز بافر، ۱۰ گرم عصاره مخمر، ۰/٤ گرم L- سیستئین و ۰/۲۵ گرم فریک پیروفسفات است

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-10-27]

که pH محیط کشت نیز توسط محلول KOH یک نرمال به میزان ۶/۹ تنظیم شد. ۳۰۰ میلی لیتر از محیط مایع را در ارلن ۱۲۰۰ میلی‌لیتری ریخته و پس از اتوکلاو، باکتری را در آن کشت داده و محیط به مدت ۳ روز در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در دستگاه انکوباتور دارای هم زن انکوبه شد. برای تأیید عدم آلودگی محیط‌های کشت (YEB) از رنگ‌آمیزی گرم و محیط کشت‌های BCYE-α بدون سیستئین و آگار خون‌دار استفاده شد (۱۸). بیوماس باکتری به دست آمده از کشت انبوه در بافر سالین استریل حل و در دمای ٤ درجه سانتیگراد و دور ۳۵۰۰×g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس برای تهیهٔ واکسن سلول کامل کشته شده باکتری، رسوب به دست آمده را در محلول سالین استریل حاوی ۰/۵٪ فرمالین به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار دادیم. پس از این زمان محلول را سانتریفیوژ کرده و مایع رویی را دور ریخته و رسوب به دست آمده چندین بار با محلول سالین استریل شستشو و سانتریفیوژ شد. پس از این مراحل برای تهیهٔ واکسن از رسوب سلول کامل کشته شدهٔ باکتری رقت CFU ٤×١٠^{٨} با روش اندازه‌گیری جذب نوری برای تزریق به موش تهیه شد (۱۹).

واکسیناسیون موش‌ها و چلنج آنها با دوز کشنده: چهار گروه از موش‌های نژاد BALB/c ماده (هر گروه شامل ۱۵ موش) انتخاب شدند. واکسیناسیون با تزریق سه دوز (برای هر دوز ۰/۵ml) به صورت داخل صفاقی در فواصل زمانی دو هفته‌ای به دو گروه انجام شد و به دو گروه دیگر به عنوان گروه‌های شاهد فقط سالین استریل تزریق شد (۱۸). دو هفته پس از آخرین واکسیناسیون به یک گروه از موش‌های واکسینه شده و یک گروه شاهد دوز کشندهٔ باکتری به میزان CFU/ml $۲/۵\times١٠^{٨}$ در ۰/۵ml برای هر موش به صورت داخل صفاقی تزریق شد همچنین پس از گذشت ٦ هفته از آخرین واکسیناسیون گروه دوم واکسینه شده وگروه دوم شاهد نیز مورد چلنج با دوز کشنده قرار گرفتند (۲۰). جهت بررسی اختلاف ایمنی‌زایی گروه‌ها از فرمول آزمون مقایسهٔ نسبت دو جامعه آماری و نرم افزار SPSS استفاده شد.

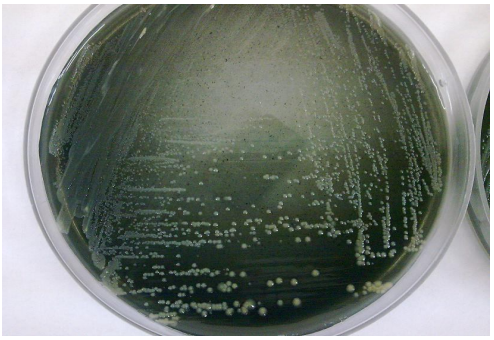
یافته‌ها

تست‌های تأییدی: پس از گذشت ٦ روز از کشت نمونه‌ها (تغلیظ شده و تیمار شده با حرارت و اسید) روی محیط کشت انتخابی، کلونی‌های مشکوک به لژیونلا مشاهده شدند. پس از جداسازی این کلونی‌ها و کشت مجدد آنها روی محیط کشتهای BCYE-α، BCYE-α بدون سیستئین و آگار خون‌دار باکتری لژیونلا جداسازی شد (شکل ۱ الف). این باکتری دارای رنگ‌آمیزی گرم ضعیف بوده همچنین مشاهدات میکروسکوپی نشان دهندهٔ یک باسیل گرم منفی است که در کشت‌های کهنه، این باکتری به صورت اشکال رشته‌ایی یا نخ مانند در زیر میکروسکوپ دیده می‌شود (شکل ۱ ب). همچنین تست‌های بیوشیمیایی تأییدی برای جداسازی لژیونلا پنوموفیلا سروتایپ ۱ انجام شد (جدول ۱). این باکتری دارای تست کاتالاز و اکسیداز مثبت ضعیف بود.

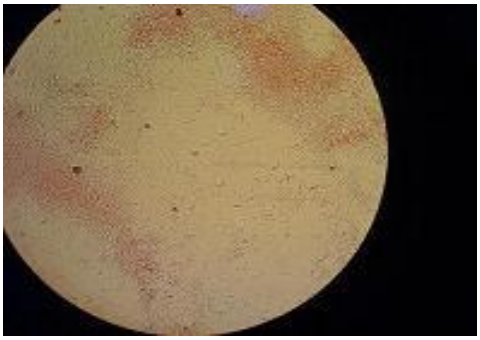
[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-10-27]

جدول ۱: نتایج تست‌های تأییدی انجام شده برای شناسایی سروتایپ ۱ لژیونلا پنوموفیلا

تست های تأییدی	تست آگلوتیناسیون	کاتالاز	اکسیداز	هیدرولیز نشاسته	هیدرولیز هیپورات	β-لاکتاماز
Legionella pneumophila	+	+	+	+	+	+



شکل۱: الف:کلونی های لژیونلا پنوموفیلا روی محیط BCYE-α



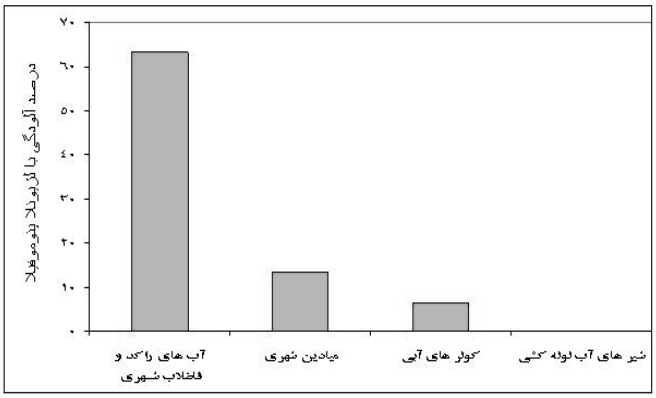
ب: رنگ آمیزی گرم لژیونلا پنوموفیلا

نتایج نمونه‌گیری: طی نمونه‌گیری از مجموع ۱۲۰ نمونهٔ گرفته شده ۳۰ نمونه از فاضلابهای شهری، ۳۰ نمونه از میادین شهری، ۳۰ نمونه از کولرهای آبی و ۳۰ نمونه از شیرهای آب لوله‌کشی گرفته شد. بیشترین آلودگی به لژیونلا مربوط به نمونه‌های آبهای راکد و فاضلاب شهری بوده و در نمونه‌های گرفته شده از شیرهای آب لوله‌کشی آلودگی به لژیونلا مشاهده نشد. نتایج به دست آمده از میزان آلودگی لژیونلا در (جدول ۲ و نمودار ۱) قابل مشاهده می‌باشند. منظور از آلودگی نمونه‌ها به گونه‌های دیگر لژیونلا، منفی شدن رشد این باکتریها روی محیط کشت‌های BCYE-α بدون سیستئین و آگار خون‌دار است در حالی که تست‌های تأییدی لژیونلا پنوموفیلا سروتایپ ۱ برای آنها منفی شد.

جدول ۲: نتایج بررسی آلودگی نمونه‌های مورد نظر به لژیونلا پنوموفیلا

نمونه‌ها	تعداد نمونه‌های گرفته شده	تعداد نمونه‌های آلوده به گونه‌های لژیونلا	تعداد نمونه‌های آلوده به لژیونلا پنوموفیلا	درصد آلودگی نمونه‌ها با لژیونلا پنوموفیلا
آبهای راکد و فاضلاب شهری	۳۰	۱۹	۱۹	٪۶۳/۳۳
میادین شهری	۳۰	٦	٤	٪۱۳/۳۳
کولرهای آبی	۳۰	۲	۲	٪٦/٦٦
شیرهای آب لوله‌کشی	۳۰	۰	۰	٪ ۰/۰
مجموع	۱۲۰	۲۷	۲۵	٪۴۳/۳۳

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-10-27]



نمودار ۱: میزان آلودگی نمونه‌های جمع‌آوری شده از نقاط مختلف

نتایج ایمنی‌زایی: پس از تهیهٔ واکسن از سلول کامل کشته شدهٔ لژیونلا پنوموفیلا سروتایپ ۱ و واکسیناسیون گروه‌های موشی مورد نظر و همچنین چلنج با دوز کشندهٔ سوش باکتری بیماری‌زا نتایج زیر به دست آمد: نتایج چلنج گروه اول (دو هفته پس از آخرین واکسیناسیون) نشان می‌دهد که واکسن تهیه شده از سلول کامل کشته شدهٔ این باکتری دارای تأثیر ایمنی‌زایی بسیار بالایی می‌باشد. همچنین نتایج چلنج گروه دوم (شش هفته پس از آخرین واکسیناسیون) نشان دهندهٔ پاسخ سریع حافظه‌ای ایمنی به وجود آمده توسط این واکسن در مقابل دوز کشندهٔ لژیونلا پنوموفیلا است (جدول۳).

جدول۳: نتایج ایمنی‌زایی سلول کامل کشته شده در گروه‌های مختلف

گروه‌های موشی مورد نظر	تعداد موش با علایم بیماری	تعداد مرگ ومیر	تعداد موش‌های زنده مانده	درصد تشخیص ایمنی‌زایی واکسن
گروه اول موش‌های واکسینه	۱	۱	۱٤	٪۹۳/۳۳
گروه اول موش‌های شاهد	۱۵	۱۵	–	–
گروه دوم موش‌های واکسینه	۳	۲	۱۳	٪۸٦/٦٦
گروه دوم موش‌های شاهد	۱۵	۱۵	–	–

در نتایج چلنج دو هفته پس از تزریق واکسن از لحاظ آماری (آزمون مقایسهٔ نسبت) بین گروه دریافت‌کنندهٔ واکسن و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری با $P<۰/۰۵$ مشاهده شد. این حالت در مقایسهٔ گروه دریافت‌کنندهٔ واکسن با گروه کنترل در چلنج بعد از ٦ هفته از تزریق نیز به دست آمد. همچنین مقایسهٔ نتایج حفاظت بخشی واکسن بعد از ۲ هفته با ٦ هفته بعد از تزریق با $p>۰/۰۵$ اختلاف معنی‌داری را در آزمون مقایسهٔ نسبت نشان نداد.

بحث

گونه‌های لژیونلا در محیط‌های آب طبیعی همچون رودخانه‌ها، برکه‌ها، چشمه‌های آب گرم، آبهای راکد و خاکهای مرطوب وجود دارند. این ارگانیسمها مدت زمان طولانی در شرایط مرطوب زنده مانده و توانایی مقاومت در شرایط دمایی صفر تا ٦۸ درجه سانتیگراد و همچنین pH برابر ۲ تا ۸/۵ را دارند. این باکتریها در سیستم‌های ساخته انسان و مخازن آبی همچون کولرهای آبی، مخازن آب گرم، شیرهای آب، سر دوش‌های

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-10-27]

حمام و سیستم‌های تهویه هوا رشد و تکثیر می‌یابند. این باکتری‌ها در بیوفیلم‌هایی که روی سطوح این سیستم‌ها تشکیل شده‌اند یافت می‌شوند (۱). این بیوفیلم‌ها مواد غذایی لازم برای این باکتری‌ها را فراهم کرده همچنین به مقاومت بیشتر آنها در برابر شرایط سخت و مواد ضد عفونی‌کننده کمک می‌کنند (۵). اکثر موارد بیماری لژیونر به وجود آمده مربوط به آلودگی سیستم‌های آبی ساخته انسان همچون کولرهای آبی و سیستم‌های تهویهٔ هوا بوده است. طی مطالعه‌ایی که توسط وست ولی در سال ۱۹۹۱ انجام شده مشاهده گردید که ٦٠٪ از ساختمانهای بزرگ و ٤٠٪ از کولرهای آبی کشور انگلستان آلوده به لژیونلا پنوموفیلا می‌باشند. بیشترین میزان آلودگی به لژیونلا پنوموفیلا در دماهای ۳۰ تا ٤٠ درجه سانتیگراد مشاهده شده است (۲۱). در یک مطالعه توسط واروارا و همکارانش در سال ۲۰۰۹ از ۹٦ دستگاه کولر آبی ۱۳٦ نمونه جمع‌آوری شد که ٤٧ نمونهٔ آن آلوده به لژیونلا پنوموفیلا بود، همچنین ۳۰ نمونه از ٤٧ نمونهٔ مثبت شده دارای آلودگی زیادی به این باکتری بوده‌اند (۲۲). در مطالعهٔ دیگری در سال ۲۰۰۹ توسط مریا کسکلا و همکارانش ۱۲۷ نمونه در مجموع جمع‌آوری شد، که ٤٧ نمونه آن از محیط و ۸۰ نمونه متعلق به بیمارستانها بوده است، در این مطالعه نشان داده شد که بیشترین آلودگی مربوط به نمونه‌های محیطی است (۲۳). در مطالعه ما نتایج نشان دادند که اکثر نمونه‌های گرفته شده در نقاط مختلف، آلوده به لژیونلا پنوموفیلا بوده‌اند. همچنین این نتایج نشان می‌دهد که آلودگی به لژیونلا پنوموفیلا در نمونه‌هایی است که دارای آلودگی بالایی با سایر باکتری‌ها بوده، که این نشان دهندهٔ رابطهٔ تکثیر و رشد لژیونلا پنوموفیلا با بیوفیلم یا دیگر جمعیت‌های میکروبی همچون آمیب‌ها است. طی این مطالعه بیشترین میزان آلودگی به این باکتری مربوط به آب‌های راکد محیطی و فاضلاب شهری به میزان ٦٣/٣٣٪ بوده است پس از آن آب میادین شهری با ۱۳/۳۳٪ و کولرهای آبی با ٦/٦٦٪ به ترتیب دارای آلودگی کمتری بوده‌اند، در حالیکه در نمونه‌های گرفته شده از شیرهای آب، آلودگی مشاهده نشد. این مطالعه نشان می‌دهد که آبهای آلودهٔ میادین شهری دارای فواره و کولرهای آبی که تولیدکنندهٔ قطره‌های ریز آب آلوده می‌باشند از عوامل ریسک پذیر برای عفونت افراد با لژیونلا پنوموفیلا می‌باشند. در مطالعات گذشته نشان داده شده است که در مورد عفونت لژیونلا پنوموفیلا آنتی‌بادی‌های تولید شده یا ایمنی هومورال در دفاع از میزبان دارای نقش کمی می‌باشند، در مقایسه ایمنی سلولی بیشترین نقش را در دفاع از میزبان و رفع آلودگی بر عهده دارد (۱۰). سرم به دست آمده از بیماران دارای عفونت به این باکتری و یا آنهایی که بهبود یافته‌اند دارای آنتی‌بادی‌هایی بر علیه فلاژل، پیلی و پروتئین شوک گرمایی لژیونلا پنوموفیلا بوده‌اند (۲۴). ویراتنا و همکارانش در سال ۱۹۹٤ نشان دادند که ترکیبات دیگر آنتی‌ژنی لژیونلا پنوموفیلا همچون پروتئین‌های غشای خارجی منجر به فعال شدن لنفوسیت‌های T و همچنین تحریک پاسخ‌های آنتی‌بادی در طول عفونت با این باکتری می‌شوند. نتایج آزمایشگاهی روی خوکچه هندی و موش نشان داده است که ترکیبات پروتئینی آنتی‌ژنیک یا (MOMP) هر دوی پاسخ‌های ایمنی ذاتی و آداپتیو را در میزبان تحریک کرده است (۲۵). در مطالعاتی که توسط گاتو و همکارانش در سال ۲۰۰٤ انجام شد نشان داده شده که عفونی کردن موش‌ها با لژیونلا پنوموفیلا هم از طریق ریه و هم با تزریق داخل رگی منجر به یک پاسخ تسریع

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-10-27]

شده و افزایش یافتهٔ آنتی‌بادی در طول عفونت دوم می‌شود که نشان دهندهٔ یک پاسخ حافظه‌ایی به عفونت این باکتری است (۲۶). همچنین ماریا لوسیا ریکی در سال ۲۰۰۵ نشان داد که موش‌های ایمن شده با فلاژل تخلیص شده لژیونلا پنوموفیلا به میزان ۱۰۰٪ در چلنج با دوز کشندهٔ این باکتری زنده ماندند، همچنین نشان داده است که ماکروفاژهایی که به لیپوپلی ساکارید (LPS) لژیونلا پنوموفیلا مقاوم شده‌اند توانایی تحریک و پاسخ به پروتئین فلاژلین این باکتری را دارند (۲۷). طی مطالعه حاضر، با جداسازی لژیونلا پنوموفیلا سروتایپ ۱ و تولید یک واکسن از سلول کامل کشته شدهٔ آن، ایمنی‌زایی این واکسن در مدل موشی بررسی شد. نتایج چلنج گروه اول نشان داد که ایمنی به وجود آمده توسط سلول کامل کشته شده بسیار مؤثر بوده چنان که بعد از چلنج، ۹۳/۳۳٪ موش‌های واکسینه شده زنده مانده اما کل موش‌های گروه شاهد کشته شدند. همچنین نتایج چلنج گروه دوم نشان می‌دهد که ایمنی‌زایی توسط سلول کامل کشته شده در یک مدت طولانی مؤثر بوده چنان که از کل گروه دوم واکسینه شده فقط دو سر موش در چلنج با دوز کشنده کشته شده‌اند که نشان دهندهٔ یک پاسخ سریع حافظه‌ایی سیستم ایمنی در مواجه با باکتری بیماری‌زا است. همچنین با مقایسهٔ آماری (آزمون مقایسهٔ نسبت) دو گروه واکسینه شده با $P>۰/۰۵$ اختلاف معنی‌داری بین این دو گروه واکسینه شده مشاهده نشد، که نشان دهندهٔ تأثیر ایمنی‌زایی واکسن تولید شده در بلند مدت است. این مشاهدات نشان می‌دهد که سلول کامل کشته شدهٔ لژیونلا پنوموفیلا یک ایمونوژن قوی در بلند مدت بوده و همچنین یک کاندید مناسب برای مطالعات بیشتر به منظور تولید یک واکسن مؤثر در برابر عفونت لژیونلا پنوموفیلا است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با کمک و حمایت مدیر گروه ارشد میکروبیولوژی و معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی زنجان انجام شده است. نویسندگان مقاله بدین وسیله تشکر و قدردانی خود را نسبت به این عزیزان ابراز می‌دارند.

References

1. BMW Diederen. Legionella spp and Legionaires disease.British Infection Society 2007; 56: 1-12.
2. Maëlle Molmeret, Dina M Bitar, Lihui Han, Yousef Abu Kwaik. Cell biology of the intracellular infection by Legionella pneumophila. Microbes and Infection 2004; 6: 129-139.
3. Yousef Abu Kwaik, Lian-Yong Gao, Barbara J. Stone, Chandrasekar Venkataraman, AND Omar S. Harb. Invasion of Protozoa by Legionella Pneumophila and Its role in bacterial ecology and pathogenesis. Applied and Environmental Microbiology 1998; 64: 3127-3133.
4. Kramer MH, Ford TE. Legionellosis: ecological factors of an environmentally 'new' disease. Zentralbl Hyg Umweltmed 1994; 195: 470-482.
5. Cooper IR, Hanlo GW. Resistance of Legionella pneumophila serotype 1 biofilms to chlorine-based disinfection. Journal of Hospital Infection 2009; 74: 152-9.
6. Agnes Lasheras, Helene Boulestreau, Anne-Marie Rogues, Celine Ohayon-Courtes, Jean-Claude Labadie, Jean-Pierre Gachie. Influence of Amoebae and physical and chemical characteristics of water on presence and proliferation of legionella species in hospital water systems. Infection Control Inc 2006; 10.1016,520-525.
7. Freedman AP, and SM. Katz. The prevalence of serum antibodies to Legionella pneumophila in patients with chronic pulmonary disease. Am Rev Respir Dis 1981; 123: 238-9.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-10-27]

8. Herman Friedman, Yoshimasa Yamamoto, and Thomas W. Klein. Legionella pneumophila pathogenesis and immunity. Elsevier Science 2002; 13: 273-279.
9. Yamamoto Y, Klein TW, Newton L and Herman Friedman. Innate and adaptive immunity to L.pneumophila. In Marre R (ed): Legionella,Washington DC: ASM Press. 2002. p. 109-119.
10. Nicole Joller, Roman Sp_rri, Hubert Hilbi and Annette Oxenius. Induction and protective role of antibodies in Legionella pneumophila infection. Eur J Immunol 2007; 37: 3414-3423.
11. Fallon R J. Identification of Legionella pneumophila with commercially available immunofluorescence test. Journal of Clinical Pathology 1986; 39: 693-694.
12. Moss C W, Weaver R E, Dees S B, Cherry W B. Cellular fatty acid composition of isolates from Legionnaires disease . Journal of Clinical Microbiology 1977; 6: 140-143.
13. Hebert G A. Hippurate hydrolysis by Legionella pneumophila. Journal of Clinical Microbiology 1981; 13: 240-242.
14. Weaver R E. Cultural and staining characteristics. Centers for Disease Control, Atlanta,Georgia 1979; 90: 39-43.
15. Thornsberry C, Baker C N, Kirven L A. Invitro activity of antimicrobial agents on Legionnaires disease bacterium. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1978; 13: 78-80.
16. Sykes R B and (ed). Methods for detecting beta-lactamases. Churchill Livingstone: Edinburgh. 1978; 64-69.
17. R H Doust A.M Mobares, S.Mirkalantar, J.Aslani and A.I Fuladi. Nosocomial legionnaires disease outbreak in Tehran. Reasearch Journal of Microbilogy 2009; 4: 3-30.
18. Blander J, Horwitz A. Vaccination with the major secretory protein of L. pneumophila induces cell-mediated and protective immunity in a guinea pig model of Legionnaires' disease. J Exp Med 1989; 169: 691-705.
19. Postgate J R. Viable counts and viability. In: Methods in microbiology, vol 1. London, Academic Press, 1969; 611-628.
20. Blander SJ, Horwitz MA. Vaccination with Legionella pneumophila membranes induces cell-mediated and protective immunity in a guinea pig model of Legionnaires' disease. Protective immunity independent of the major secretory protein of Legionella pneumophila. J Clin Invest 1991; 87: 1054-9.
21. Lee JV, West A. Survival and growth of Legionella species in the environment. J Appl Bacteriol Symp Supp 1991; 70: 121-129.
22. Varvara A Mouchtouri Goutziana G, Kremastinou J, Hadjichristodoulou C. Legionella species colonization in cooling towers: risk factors and assessment of control measures. Am J Infect Control 2009; 38: 1-6.
23. Mireia Coscolla, Fernando Gonza´ lez-Candelas .Comparison of clinical and environmental samples of Legionella pneumophila at the nucleotide sequence level. Infection, Genetics and Evolution 2009; 9: 882-888.
24. Hoffman, P. S., L. Houston, and C. A. Butler. Legionella pneumophila htpAB heat shock operon: nucleotide sequence and expression of the 60-kilodalton antigen in L. pneumophila-infected HeLa cells. Infect Immun1990; 58: 3380-7.
25. Weeratna RDA, Stamler PH Edelstein, M Ripley T, Marrie D Hoskin, and PS Hoffman. Human and guinea pig immune responses to Legionella pneumophila protein antigens OmpS and Hsp60. Infect Immun 1994; 62: 3454-62.
26. Gatto D, Ruedl C, Odermatt B and Bachmann MF. Rapid response of marginal zone B cells to viral particles. J Immuno 2004; 173: 4308-4316.
27. Maria Luisa Ricci, Antonella Torosantucci, Maria Scaturro, Paola Chiani, Lucilla Baldassarri, Maddalena Castellani Pastoris. Induction of protective immunity by Legionella pneumophila flagellum in an A/J mouse model. Vaccine 2005: 23 4811-4820.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-10-27]